

Caracterização de fluorescência de *carbon dots* visando sua aplicação no cultivo de microalgas

Samuel Nunes Limberger¹, Daniela Flávia Machado Turati², Rogério Gomes Faria³, Marcelo Oliveira Rodrigues⁴, Luiz Fernando Roncaratti Júnior⁵, Lorena Costa Garcia Calsing⁶, Rossano Gambetta⁷, Letícia Jungmann Cançado⁸

Resumo

O cultivo de microalgas pode representar uma possibilidade interessante para a produção de combustíveis renováveis, porém ainda não é economicamente viável para essa finalidade. Alguns estudos demonstram incremento na produção de biomassa algal ao utilizar, no cultivo, *carbon quantum dots* (CQD), nanopartículas fluorescentes de carbono. Ainda não há um consenso sobre o mecanismo de interação dos CQDs com as microalgas, podendo ser: ou por melhorar a eficiência na captura de luz, ou por gerar carbono inorgânico in situ. Neste trabalho foi feita a caracterização físico-química preliminar de um CQD para sua aplicação no cultivo de microalgas, de modo a fornecer bases para compreensão do mecanismo de ação nas microalgas. Ensaio fluorimétricos foram realizados com um CQD em diferentes pHs (5, 6, 7, 8 e 9) e após diferentes intervalos de tempo expostos à luz (0, 7 e 14 dias). Os resultados indicam que o pH muda o perfil da fluorescência, o que pode ser causado pela existência de grupos carboxila na superfície do CQD estudado. Além disso, há fotodecomposição das nanopartículas, essa reação se estabiliza após 7 dias. Os CQDs são menos afetados em pHs alcalinos do que em pHs ácidos. Dessa forma, os CQDs serão degradados durante o cultivo e sua fluorescência não será estável ao longo do tempo, o que sugere que se faça uma investigação sobre se os fragmentos dos CQDs podem ser utilizados como fonte de carbono pelas microalgas.

Palavras-chave: *carbon quantum dots*, microalgas, fluorescência.

Introdução

A demanda energética mundial aumenta cerca de 1,3% a cada ano, e ainda há grande dependência das energias fósseis como o carvão (IEA, 2018, 2019). Com o aquecimento global, é imperativo encontrar fontes de energia renováveis, a fim de alcançar emissões de gases do efeito estufa líquidas próximas de zero, e que possam suprir esse crescente consumo de energia (IEA, 2020). Nessa busca, a pesquisa com microalgas ganha destaque

¹ Graduando em Química, Universidade de Brasília, bolsista CNPq ITI-A da Embrapa Agroenergia, samuel.n.limberger@gmail.com

² Bióloga, mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), bolsista CNPq DTI-B da Embrapa Agroenergia, daniela.flavia@colaborador.embrapa.br

³ Doutorando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, rogerio.faria@unb.br

⁴ Químico, doutor em Química, Universidade Federal de Pernambuco, professor-adjunto da Universidade de Brasília, marcelo.rodrigues@nottingham.ac.uk

⁵ Físico, doutor em Química, professor-adjunto da Universidade de Brasília, lz@fis.unb.br

⁶ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁷ Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

desde 2005, com cerca de 1.000 artigos científicos por ano, desde 2016, segundo a base de dados Scopus. A biomassa algal contém uma variedade de lipídeos, carboidratos, pigmentos, proteínas, enzimas e antioxidantes. Este fato possibilita uma rica gama de aplicações que envolvem: biocombustíveis (biodiesel, lipídeos, etanol e hidrogênio), tratamento de resíduos, materiais, cosméticos, nutracêuticos, indústria alimentícia e nutrição animal. Em especial, o desenvolvimento de biocombustíveis e o tratamento de resíduos podem ser importantes ferramentas para o arrefecimento das mudanças climáticas (Jalilian; Najafpour; Khajouei, 2020).

As microalgas são um conjunto de seres fotossintetizantes. Ao cultivá-las de modo autótrofo, haverá a captura de CO_2 presente no ar e a formação de O_2 e glicose. Apesar de a combustão dos biocombustíveis de microalgas liberarem CO_2 , a emissão líquida de gases do efeito estufa pode ser próxima de zero. Somem-se a isso outros benefícios como menor área de cultivo em relação a outras culturas (como a soja), a ausência de competição com a produção de alimentos e a possibilidade de usar efluentes industriais e urbanos na produção (Schenk et al., 2008). Entretanto, as etapas de cultivo, colheita e pós-tratamento da biomassa são muito onerosas. Para que houvesse uma viabilidade econômica nos produtos combustíveis derivados de microalgas, os preços por quilograma de biomassa deveriam ser menores que um Euro, mas os preços variam entre um e cinco Euros (Fernández; Sevilla; Grima, 2019).

Dessa forma, exige-se grande desenvolvimento científico na produção de biomassa de microalgas a fim de que os produtos combustíveis finais sejam competitivos. Nesse contexto, algumas pesquisas apontam que o uso de nanopartículas de carbono, *carbon quantum dots* (CQD), no cultivo de microalgas pode aumentar a produção de biomassa ou a concentração de biomoléculas desejáveis (Xue et al., 2020). CQDs são aglomerados de centenas ou milhares de átomos, com diâmetros de partícula que variam entre 1 e 10 nanômetros. Tal associação numericamente pequena de átomos permite características óticas e eletrônicas únicas, com grande destaque para a fluorescência. Esta é observada por causa das transições eletrônicas por bandas proibidas de energia (*bandgaps*) dos orbitais π conjugados e defeitos de superfície que aprisionam a energia (Lim; Shen; Gao, 2015). Há inúmeros métodos de síntese dos CQDs; o hidrotermal, o eletroquímico, a irradiação com ultrassom e a pirólise são alguns deles. Também há a possibilidade de adicionar outros compostos em menores quantidades para mudar as propriedades eletrônicas dos CQDs (dopagem). Os compostos mais usados são com nitrogênio, enxofre e sais inorgânicos (Molaei, 2019).

Assim, tanto pela grande variedade de CQDs quanto pela pequena quantidade de estudos, ainda não está claro como ocorre a interação entre os CQDs e as microalgas. Alguns artigos sugerem que o benefício das partículas é a conversão de luz, ou seja, comprimentos de onda não utilizados (ultravioleta) são convertidos em radiação fotossinteticamente ativa (azul visível), melhorando a capacidade de captura da luz pelas células e ampliando a atividade fotossintética (Choi et al., 2020). Outros trabalhos propõem que as microalgas conseguem degradar os CQDs usando enzimas oxidativas, gerando CO_2 dentro da alga, o que facilita a captura de CO_2 e, destarte, aumenta a atividade fotossintética (Zhang et al., 2018).

Este trabalho consiste em um estudo preliminar de um CQD visando sua aplicação no cultivo de microalgas. Amostras de CQD em diferentes condições (tempo, pH, exposição à luz e armazenamento no escuro) tiveram a fluorescência analisada, gerando resultados interessantes que apontam a dependência principalmente do pH e da exposição à

luz na atividade de fluorescência do CQD analisado. Essas análises servirão de base para futuras pesquisas visando compreender tanto a interação destes CQDs com as microalgas, como para possíveis otimizações de características para CQDs sintetizados para essa finalidade.

Material e Métodos

Preparação das amostras

As amostras do Carbon Dot Krill A32 (CDA32) foram cedidas pela *startup* KrillTech. A nanopartícula e a metodologia de síntese são objeto de pedido de proteção patentária (processo de número BR 10 2020 002172 9), de titularidade da Embrapa, da UnB e da KrillTech. O CDA32 é feito por meio de processo hidrotermal e tem dopagem com nitrogênio. Foram preparadas 3 soluções de 50 mg/L com o CDA32. Cada solução foi dividida em 5 recipientes. Utilizando uma solução de hidróxido de sódio 12 mg/L, o pH de cada recipiente foi ajustado para que cada replicata tivesse 5 soluções com o respectivo pH: 5, 6, 7, 8 e 9. Entre os ensaios fluorimétricos, as amostras foram armazenadas em frascos tampados transparentes e irradiadas, a uma mesma distância, por iluminação de lâmpadas fluorescentes tubulares. Em um mesmo pH, foi amostrado um volume de 3 mL de cada replicata para servir de controle. Essa solução de controle foi armazenada no escuro.

Ensaaios fluorimétricos

Os ensaios fluorimétricos foram realizados no espectrofotômetro SpectraMax M2 da marca Molecular Devices utilizando uma cubeta de quartzo. As amostras foram excitadas nos comprimentos de onda 320 nm, 335 nm, 350 nm, 365 nm e 380 nm. A fluorescência emitida foi coletada no intervalo de 360 nm a 800 nm. Os ensaios foram feitos nos dias 0, 7 e 14, contados a partir da preparação das soluções.

Testes estatísticos

Por ter a maior intensidade de fluorescência, os dados do comprimento de excitação 365 nm foram utilizados para as comparações com os testes estatísticos. Quando foram comparadas amostras em diferentes condições (pHs diferentes ou número de dias diferentes), foi utilizado o teste T de Student para diferenciar as médias com 95% de confiança, de modo a determinar se os valores eram diferentes estatisticamente. Já as comparações com o controle guardado no escuro foram feitas utilizando um teste T de Student simples com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

O ambiente do cultivo de microalgas é bem diferente de uma aplicação pontual de CQDs como a bioimagem. Geralmente os cultivos de microalgas podem durar mais de 14 dias, são muito oxigenados e precisam de iluminação frequente. Todos esses fatores contribuem para um meio de fácil degradação de moléculas orgânicas. Assim, um estudo

em que há a intensidade de fluorescência dos CQDs expostos a essas condições pode dar uma maior clareza sobre o mecanismo de interação dos CQDs com as microalgas. Este estudo dará importantes ferramentas para uma síntese orientada a gerar CQDs com propriedades que maximizem os benefícios dessa interação e, conseqüentemente, proporcionem maior produtividade de biomassa de microalgas.

Além disso, o pH do meio está muito relacionado com o metabolismo da microalga e os nutrientes disponíveis. O consumo de NH_4^+ pelas microalgas causa a acidificação do meio pela liberação de íons H^+ , podendo variar de pH 7 até próximo de 3, enquanto o consumo de íons HCO_3^- está ligado à formação de hidroxilas e alcalinização do meio, o que pode gerar valores de pH próximos de 9 (Ribeiro et al., 2020). Ademais, estudos com controle de pH apontam que pHs alcalinos podem gerar um aumento da densidade celular das microalgas (Gong et al., 2014). Por isso, também optou-se por verificar o comportamento da fluorescência do CDA32 em diferentes pHs.

Influência do pH na fluorescência

A Figura 1 mostra as diferentes curvas de fluorescências em diferentes condições do CDA32. É possível perceber que diferentes pHs tiveram diferentes comportamentos de fluorescência. Os testes estatísticos entre as curvas de fluorescência no dia zero resultaram em dois grupos de fluorescência semelhantes: um grupo ácido (pH 5, 6 e 7) e um grupo básico (pH 8 e 9). O primeiro apresentou uma intensidade de fluorescência média de 1365 a.u., enquanto que, no segundo, houve uma intensidade média um pouco menor de 1060 a.u. O pico de emissão continuou no comprimento de onda de 450 nm.

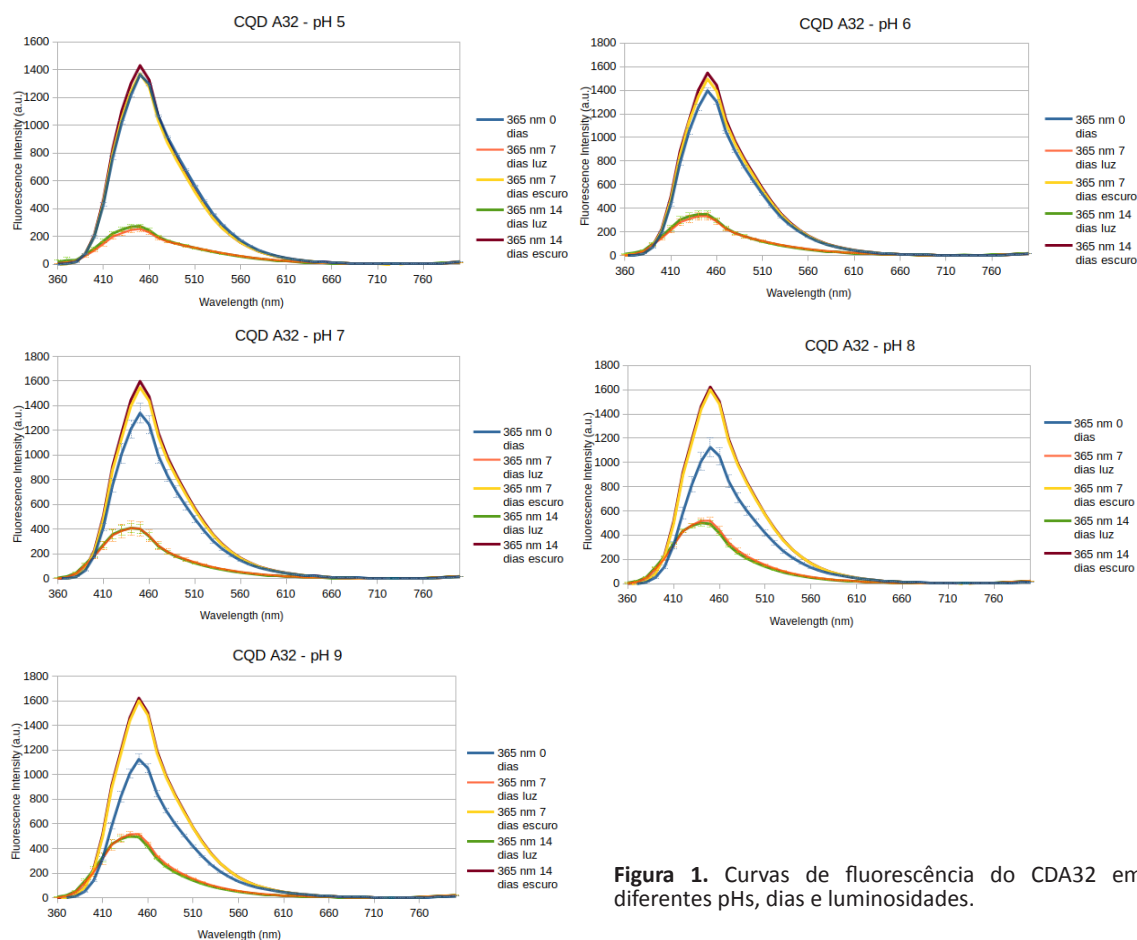


Figura 1. Curvas de fluorescência do CDA32 em diferentes pHs, dias e luminosidades.

A Figura 2 é um espectro de infravermelho do CDA32. A caracterização dos sinais seria: 3196 cm^{-1} , O-H de ácido carboxílico; 1706 cm^{-1} , C=O de ácido carboxílico conjugado; 1553 cm^{-1} , C=C de alceno conjugado. De posse desses dados, é possível admitir que na superfície da nanopartícula há grupos funcionais carboxila (-COOH), que, dependendo do valor de pH, poderão estar protonados ou não. Usando um valor de constante ácida de um ácido orgânico conjugado como referência, o ácido acrílico com $\text{pK}_a = 4,72$; significaria dizer que, no pH 5, ainda haveria uma concentração quase igual de carboxilas e carboxilatos ($-\text{COO}^-$) na superfície do CDA32. Com o aumento do pH, há o aumento de carboxilatos em solução, e, provavelmente, nos pHs 8 e 9, apenas carboxilatos. Assim, como o íon carboxilato apresenta uma carga negativa em ressonância com a ligação dupla da carbonila, há uma diferença na distribuição de cargas na superfície da nanopartícula. Logo, é de se esperar mudanças nas bandas energéticas de orbitais π conjugados e, portanto, curvas de fluorescência diferentes.

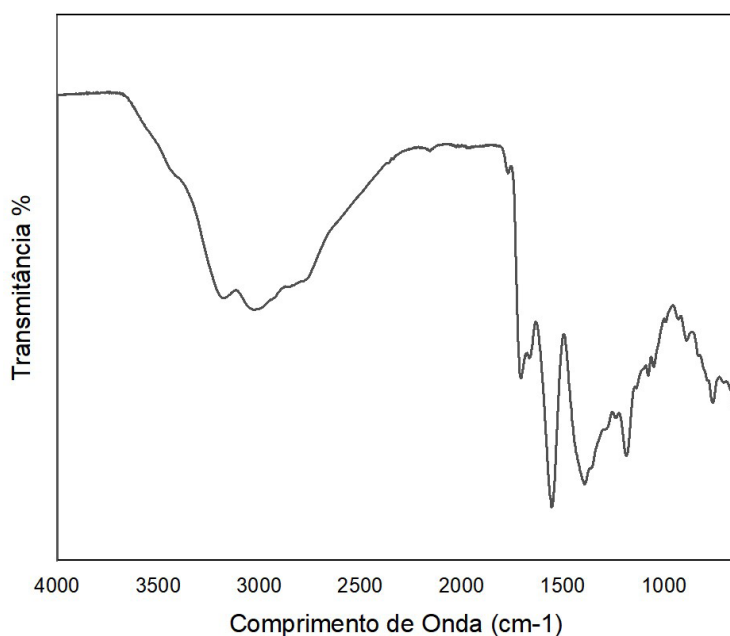


Figura 2. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier do CDA32.

Influência da luz na fluorescência

As curvas demonstram que houve perdas de intensidade de fluorescência de mais de 55% nas amostras após 7 dias de irradiação luminosa em comparação com o dia 0 (zero). Por outro lado, as amostras armazenadas no escuro não tiveram perda de intensidade de fluorescência. Assim como a luz aparenta ser a principal causa da perda de atividade fluorescente, reações de oxidação fotocatalisadas podem ter causado a perda de arranjos estruturais importantes que geravam a fluorescência.

Interessantemente, todas as amostras no escuro após 7 ou 14 dias apresentaram alguma mudança estatística em relação ao perfil de fluorescência verificado no dia 0. É possível notar que houve um aumento de intensidade de fluorescência em quase todos os pHs. Isso indica que, além da luz, há algum outro fator que possa contribuir para a mudança desses fenômenos de superfície do CDA32, consequentemente, gerando curvas de fluorescência distintas.

As curvas de fluorescência em um mesmo pH entre o dia 7 e o dia 14 são estatisticamente equivalentes em quase todos os pHs, com exceção do pH 9. Esse fato sugere que essas reações de degradação possam chegar a uma espécie de equilíbrio em que a taxa de degradação aparente da nanopartícula fique próxima de zero e o perfil de fluorescência permaneça praticamente constante.

Com base na semelhança observada entre os dias 7 e 14, foi feita uma análise comparativa entre os diferentes pHs no dia 7. O grupo básico (pH 8 e 9) permaneceu estatisticamente semelhante entre si e exibiu intensidade de fluorescência média de 500 a.u. (55% de perda em relação à inicial). Já o grupo ácido mostrou diferenças em relação aos perfis observados no dia 0, os pHs 6 e 7 continuaram semelhantes entre si com intensidade média de 375 a.u. (73% de perda) e o pH 5 apresentou intensidade média de 250 a.u. (81% de perda). Essas informações podem indicar que o grupo carboxilato é importante para a proteção da nanopartícula contra a fotodegradação.

Análise dos dados orientada pelo cultivo de microalgas

Considerando os dados apresentados, se adotada a hipótese de que os CQDs aumentam a produtividade das microalgas por meio da fluorescência, o CDA32 estudado apresenta uma estabilidade de fluorescência que não é tão compatível com os longos intervalos de tempo de cultivo sob irradiação luminosa. Considerando um cultivo no pH 7, haverá perdas de intensidade de fluorescência na faixa de 70% após 7 dias. É claro que, após a estabilização da fluorescência, depois de 7 dias a emissão de fótons dos CQDs ainda pode ser útil para as microalgas, mesmo com a intensidade menor. Uma possibilidade seriam cultivos alcalinos com controle de pH, nos quais as perdas na fluorescência seriam menores e, supõe-se, os benefícios, tanto da criação em meios básicos quanto do uso de CQDs, possam ser acrescidos. Entretanto, esse tipo de monitoramento é dispendioso e o cultivo em meio alcalino pode não ser viável.

Por outro lado, se também adotada a hipótese de que os CQDs são uma fonte de carbono para as microalgas, esse tipo de processo de degradação seria muito desejado. Soma-se que, se as nanopartículas não sofressem modificações, na etapa de colheita, seria imperativo uma forma de separar os CQDs das microalgas. Dessa forma a fotodecomposição dos CQDs pode também ser um fenômeno muito interessante para o cultivo das microalgas já que, além de fornecer os fótons de iluminação, pode-se gerar nutrientes no próprio meio.

Conclusão

O carbon dot KrillTech A32 foi analisado em diferentes pHs, sob irradiação luminosa ou não, por 14 dias. Os resultados sugerem interessantes correlações entre estrutura das nanopartículas e emissão de fluorescência, além de indicações da reação de degradação dos CQDs que certamente é catalisada pela luz. Esses dados podem ser utilizados para um melhor esclarecimento sobre como os CQDs geram os benefícios observados no cultivo de microalgas. Também podem ser utilizados para o planejamento de síntese de nanopartículas com propriedades estruturais mais estáveis. A partir deste estudo, seria interessante o uso de espectroscopia de massas para o acompanhamento de como o CQD é fragmentado pela fotodecomposição e se essas frações poderiam ser utilizadas pelas microalgas.

Referências

- CHOI, S. A. et al. Biocompatible liquid-type carbon nanodots (C-paints) as light delivery materials for cell growth and astaxanthin induction of *Haematococcus pluvialis*. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 109, p. 110500, 2020.
- FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Costs analysis of microalgae production. In: **Biofuels from Algae**. 2nd. ed. Almería, Espanha: Elsevier B.V., p. 551–566, 2019.
- GONG, Q. et al. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. **Energy Procedia**, [S.l.], v. 61, p. 2012–2015, 2014.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Coal 2018**: relatório técnico. Paris, 2018. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/coal-2018>. Acesso em: 20 set. 2020.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **World Energy Outlook 2019**: relatório técnico. Paris, 2019. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2019>. Acesso em: 20 set. 2020.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Energy Technology Perspectives 2020**: relatório técnico. Paris, 2020. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/energy-technology-perspectives-2020>. Acesso em: 20 set. 2020.
- JALILIAN, N.; NAJAFPOUR, G. D.; KHAJOU EI, M. Macro and Micro Algae in Pollution Control and Biofuel Production – A Review. **ChemBioEng Reviews**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 18–33, 2020.
- LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.
- MOLAEI, M. J. Carbon quantum dots and their biomedical and therapeutic applications: A review. **RSC Advances**, [S.l.], v. 9, n. 12, p. 6460–6481, 2019.
- RIBEIRO, D. M. et al. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, [S.l.], v. 9, n. October 2019, p. 110500-110519, 2020.
- SCHENK, P. M. et al. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **BioEnergy Research**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 20–43, 2008.
- XUE, R. et al. Promoting *Chlorella* photosynthesis and bioresource production using directionally prepared carbon dots with tunable emission. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.l.], v. 569, p. 195–203, 2020.
- ZHANG, M. et al. Pristine carbon dots boost the growth of *Chlorella vulgaris* by enhancing photosynthesis. **ACS Applied Bio Materials**, Washington, v. 1, n. 3, p. 894–902, 2018.